

NISIN COMPOSITIONS FOR USE AS ENHANCED, BROAD RANGE BACTERICIDES.

(FI8905878)

Lantioninhaltiga bakteriocinkompositioner för användning som förbättrade baktericider med ett brett spektrum**NISIN-SAMMENSETNINGER ANVENDT SOM BREDSPEKTRERE BAKTERICIDER.****PRAEPARAT INDEHOLDENDE ET LANTHIONIN-HOLDIGT BACTERIOCIN OG ET CHELATERINGSMIDDEL**

(EP-382814)

Bacteriocin compositions comprising lantionine containing bacteriocins and non-bactericidal agents. When the bacteriocin compositions are combined with a suitable carrier with each component present in sufficient quantities such that the composition is effective against Gram negative bacteria in addition to Gram positive bacteria, they become enhanced, rapid acting, broad range bactericides suitable for a variety of applications.

(From WO8912399 A1)








Inventor: BLACKBURN PETER
POLAK JUNE
GUSIK SARA-ANN
RUBINO STEPHEN D























































Patent Assignee: AMBI INC
APPLIED MICROBIOLOGY
APPLIED MICROBIOLOGY INC
HEALTH RES INST SITY NEW YORK
NEW YORK HEALTH RES INST
STATE STREET BANK AND TRUST COMPANY
TECHVENTURE PTE LTD
UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY
































































Orig. Applicant/Assignee: APPLIED MICROBIOLOGY, INC.; 170 53rd Street; Brooklyn, N.Y. 11232 (US)

Patent Assignee History: (A1) NEW YORK HEALTH RES INST (US)
(B1) APPLIED MICROBIOLOGY INC (US)
(A2) APPLIED MICROBIOLOGY INC (US)
TAY, TENG-TIOW; FROM 19910211 TO 19960502
AMBI, INC.; FROM 19910211 TO 19970811
PUBLIC HEALTH RESEARCH INSTITUTE OF THE CITY OF NEW YORK, INC., THE; FROM 19910211 TO 20061215
APPLIED MICROBIOLOGY; FROM 19921006
TECHVENTURE PTE LTD; FROM 19960502
STATE STREET BANK AND TRUST COMPANY; FROM 19970811
UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY; FROM 20061215
PUBLIC HEALTH RESEARCH INSTITUTE OF THE CITY OF NEW YORK, INC., THE; FROM 19920121 TO 19921006
CITIZENS BANK OF MASSACHUSETTS; FROM 19920121 TO 20011212
APPLIED MICROBIOLOGY; FROM 19921006
AMBI, INC.; FROM 19970811 TO 19970811
STATE STREET BANK AND TRUST COMPANY; FROM 19970811 TO 20011212
PUBLIC HEALTH RESEARCH INSTITUTE OF THE CITY OF NEW YORK, INC., THE; FROM 19920417 TO 19921006
CITIZENS BANK OF MASSACHUSETTS; FROM 19920417 TO 20011212
APPLIED MICROBIOLOGY; FROM 19921006
AMBI, INC.; FROM 19970811 TO 19970811
STATE STREET BANK AND TRUST COMPANY; FROM 19970811 TO 20011212
(A1) NEW YORK HEALTH RES INST (US)
(D1) APPLIED MICROBIOLOGY INC (US)
(D1) APPLIED MICROBIOLOGY INC (US)

FamPat family

Publication Number	Kind	Publication date	Links
FI895878	D0	19891208	 
STG:		Patent application filed	
AP :		1989FI-0005878 19891208	
NO895147	D0	19891220	 
STG:		Patent application filed	
AP :		1989NO-0005147 19891220	
IE940624	L	19891222	  
STG:		Abstracts	

AP :	1924IE-0009406 19890621	  
IE892015	L 19891222	
STG:	Abstracts	
AP :	1989IE-0002015 19890621	   
WO8912399	A1 19891228	
STG:	International publication with international search report	
AP :	1989WO-US02625 19890616	
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]	
NO895147	A 19891228	  
STG:	Patent application made available to the public	
AU3843089	A 19900112	   
STG:	Open to public inspection	
AP :	1989AU-0038430 19890616	
IL90700	D0 19900118	 
STG:	Patent application filed	
AP :	1989IL-0090700 19890621	
DK45690	D0 19900221	 
STG:	Patent application filed	
AP :	1990DK-0000456 19900221	
DK45690	A 19900221	   
STG:	Patent application made available to the public	
HU893794	D0 19900628	 
STG:	Filing application	
AP :	1989HU-0003794 19890616	
EP0382814	A1 19900822	   
STG:	Application published with search report	
AP :	1989EP-0907595 19890616	
HU53795	A2 19901228	  
STG:	Examined patent application	
JP3500051	T 19910110	   
STG:	Unexam. pat appl. on foreign appl.	
AP :	1989JP-0507148 19890616	
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]	
HU204980	B 19920330	  
STG:	Patent with search report	
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]	
US5135910	A 19920804	   
STG:	Patent	
AP :	1991US-0653627 19910211	
FD :	Continuation of: US317626 19890331 [1989US-0317626]	
FD :	CIP of: US209861 19880622 [1988US-0209861]	
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]	
AU631803	B2 19921210	   
STG:	Patent preceded by A1	
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]	
NZ229674	A 19921223	   
STG:	Patent application	
AP :	1989NZ-0229674 19890622	
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]	
US5217950	A 19930608	   
STG:	Patent	
AP :	1992US-0822777 19920121	
FD :	Continuation of: US317626 19890301 [1989US-0317626]	
FD :	(Abandoned)	
FD :	CIP of: US209861 19880622 [1988US-0209861]	
FD :	(Abandoned)	
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]	
EP0545911	A2 19930609	

STG:	Application published without search report				
AP :	1993EP-0200152 19890616				
EP0545911	A3 19930728				
STG:	Search report				
US5260271	A 19931109				
STG:	Patent				
AP :	1992US-0870803 19920417				
FD :	Continuation of: US317626 19890301 [1989US-0317626] (Abandoned)				
FD :	CIP of: US209861 19880622 [1988US-0209861] (Abandoned)				
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]				
EP0382814	B1 19940216				
STG:	Patent specification				
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]				
AT101490	T 19940315				
STG:	Translation of European patent specification				
AP :	1989AT-0907595 19890616				
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]				
DE68913189	D1 19940324				
STG:	Granted EP number in Bulletin				
AP :	1989DE-6013189 19890616				
DE68913189	T2 19940519				
STG:	Trans. of EP patent				
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]				
IL90700	A 19940624				
STG:	Application of patent for invention				
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]				
DD301912	A9 19940714				
STG:	Doc. laid open (First publication)				
AP :	1990DD-0336940 19900104				
IE63998	B1 19950628				
STG:	Patent specification				
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]				
JP8009525	B 19960131				
STG:	Publd. examined patent applic.				
AP :	1989JP-0507148 19890616				
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]				
DK171069	B1 19960528				
STG:	Patent specification				
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]				
NO179354	B 19960617				
STG:	Document laid open for public inspection				
EP0545911	B1 19960911				
STG:	Patent specification				
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]				
FD :	Division of: EP89907595A 19890616 [1989EP-0907595]				
AT142504	T 19960915				
STG:	Translation of European patent specification				
AP :	1993AT-0200152 19890616				
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]				
NO179354	C 19960925				
STG:	Patent				
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-				

0006897]
DE68927189 D1 19961017
STG: Granted EP number in Bulletin
AP : 1989DE-6027189 19890616
DE68927189 T2 19970130
STG: Trans. of EP patent
FD : Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-
0006897]
FI98880 B 19970530
STG: Examined application
FI98880 C 19970910
STG: Patent
FD : Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-
0006897]
IE77643 B1 19971231
STG: Patent specification

**Priority Nbr:**

1988US-0209861 19880622
1989CS-0006897 19891206
1989EP-0907595 19890616
1989US-0317626 19890301
1989WO-US02625 19890616
1991US-0653627 19910211
1992US-0822777 19920121
1992US-0870803 19920417

Designated States:

(WO8912399)
AU DK FI HU JP KR MC NO SU
European patent : AT BE CH DE FR GB IT LU NL SE

Cited Reference 2.

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平3-500051

⑬ 公表 平成3年(1991)1月10日

⑭ Int. Cl.⁵
A 01 N 63/00
63/02
A 23 C 3/08

識別記号

庁内整理番号

A 7057-4H
Z 7057-4H
8114-4B※

審査請求 未請求
予備審査請求 未請求

部門(区分) 3(2)

(全 14 頁)

⑮ 発明の名称 強化広域殺菌剤として使用されるナisin組成物

⑯ 特 願 平1-507148

⑰ 出 願 平1(1989)6月16日

⑱ 翻訳文提出日 平1(1989)12月22日

⑲ 国際出願 PCT/US89/02625

⑳ 国際公開番号 WO89/12399

㉑ 国際公開日 平1(1989)12月28日

優先権主張 ㉒ 1988年6月22日 ㉓ 米国(US) ㉔ 209,861

⑳ 発 明 者 ブラックバーン ピーター アメリカ合衆国 10036 ニューヨーク州 ニューヨーク ウェスト 44番 ストリート 426

㉑ 出 願 人 バブリック ヘルス リサーチ アメリカ合衆国 10016 ニューヨーク州 ニューヨーク ファースト インステテュート オブ スト アヴェニュー 455
ザ シティ オブ ニューヨーク

㉒ 代 理 人 弁理士 三澤 正義

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), MC, NL(広域特許), NO, SE(広域特許), SU

最終頁に続く

請求の範囲

1. ランチオニン含有バクテリオシンとキレート剤から成る組成物。
2. ランチオニン含有バクテリオシンと界面活性剤から成る組成物。
3. ランチオニン含有バクテリオシン、キレート剤及び界面活性剤から成る組成物。
4. 前記ランチオニン含有バクテリオシンがナisin、サブチリン、エビデルミン、シンナマイシン、ジュラマイシン、アンコベニン及びペプ(Per) 5 から成る群から選択される請求の範囲1、2又は3に記載の組成物。
5. 前記キレート剤がアルキルジアミン四酢酸、Ca EDTA、Na₂Ca EDTA、EGTA及びクエン酸塩から成る群から選択させる請求の範囲1又は3に記載の組成物。
6. 前記アルキルジアミン四酢酸がEDTAで、前記バクテリオシンがナisinである請求の範囲5に記載の組成物。
7. 前記界面活性剤がトリトン類(Tritons)、ツウィーン類(Tweens)、グリセリド類、脂肪酸類、乳化剤、四価の化合物類、両性及び陰イオン性界面活性剤から成る群から選択される請求の範囲2又は3に記載の組成物。
8. 食品保存料を同様に含有する請求の範囲1に記載の組成物。

9. 担体、ランチオニン含有バクテリオシン及びキレート剤から成る強化広域殺菌剤。

10. 担体及びランチオニン含有バクテリオシン及び界面活性剤から成る強化広域殺菌剤。

11. 担体、ランチオニン含有バクテリオシン、キレート剤及び界面活性剤から成る強化広域殺菌剤。

12. ナisin、サブチリン、エビデルミン、シンナマイシン、ジュラマイシン、アンコベニン及びペプ(Per) 5 から成る群から選択されたランチオニン含有バクテリオシン及びアルキルジアミン四酢酸、EGTA及びクエン酸塩から成る群から選択されたキレート剤が、前記殺菌剤がスタフィロコッカス・オーレウス(*Staphylococcus aureus*)、ストレプトコッカス・ムータンス(*Streptococcus mutans*)、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ(*Streptococcus agalactiae*)、コリネホルム(*Corynebacterium*) 菌、サルモネラ・チフムリウム(*Salmonella typhimurium*)、エスシェリシア・コリ(*Escherichia coli*)、クレブシエラ・ニューモニア(*Klebsiella pneumoniae*)、シュードモナス・オールギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*)、バクテリオイデス・ジギバリス(*Bacterioides gingivalis*)及びアクチノバシラス・アクチノマイセテスコミタンス(*Actinobacillus actinomycetecombians*) から成る群の細菌類の少なくともひとつに対して増強された有効性を保持する量存在する請求の範囲9、10又は11に記載の強化広域殺菌剤。

明 細 書

発明の名称

強化広域殺菌剤として使用される

ナイシン組成物

発明の背景

本願は、1988年6月22日出願の第209,861号の一部継続出願である。ナイシンは、抗菌性を有するポリペプチドで、細菌 ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*) の種々の株によって天然に産生される。ナイシンは、ある種のグラム陽性桿菌の芽胞成長を阻害する公知の食品保存料である。

時に間違ったり不正確な言い方で抗生物質と言われることもあるが、ナイシンはより正確にはバクテリオシン、すなわち、細菌によって産生されるタンパク質性物質でその原理に近縁の種に対してのみ抗菌活性を有するものとして分類される。ナイシンは、牛乳及びチーズ中に低濃度に見られる天然由来の保存料であり、ヒトに対し全く毒性がなくしかもアレルギー性が皆無であると信じられている。

ナイシンは最近FDAによって、殺菌チーズスプレッド、殺菌プロセスチーズスプレッド及び果物、野菜又は肉入殺菌チーズスプレッド又は同殺菌プロセスチーズスプレッドの直接食品含有物として安全であると認められた。更に、ナイシンはポリペプチドであるので、食品中に残留するナイシン残留物は全て迅速に消化される。

ナイシンの特性についての総説は、ハースト

13. 前記アルキルジアミン四酢酸がEDTAである請求の範囲12に記載の強化広域殺菌剤。

14. 前記界面活性剤がトリトン類 (Tritons)、ツウィーン類 (Tweens)、グリセリド類、脂肪酸、四価の化合物類、乳化剤、両性及び陰イオン性界面活性剤から成る群から選択されかつ前記殺菌剤がグラム陰性菌及びグラム陽性菌から成る群の細菌類の少なくともひとつに対し増強された有効性を保持するに充分な量だけ前記界面活性剤が存在する請求の範囲10又は11に記載の強化広域殺菌剤。

15. ナイシンの濃度が約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と300.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間にあり、キレート剤の濃度が0.1 mMと2.0 mMの間にある請求の範囲12に記載の強化広域殺菌剤。

16. 界面活性剤の濃度が約0.01%と1.0%の間にある請求の範囲14に記載の強化広域殺菌剤。

(Horst) A による アドバンシス・イン・アブライド・マイクロバイオロジー (Advances in Applied Microbiology) 21:85-123 (1981) に記載されている。この報文は、ナイシンについて一般に公知であることを記載している。ナイシンは ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*) によって産生され、アプリン & バレット社 (Apline & Barret Ltd.), ドアセット (Dorset), 英国から純粋でない調製物ニサプリン™ (Nisaplin™) として商業的に入手可能であり、また、ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*) の培養物から天然のナイシンを単離しこのナイシンを公知の方法で濃縮することによって得ることもできる。別の株の ストレプトコッカス を用いてナイシンを製造する方法もまた報告されている。1987年12月29日発行ゴンザレス (Gonzalez) らによる米国特許第4,716,115号を参照。組換えDNA技術によってナイシンを製造することもまた可能なはずである。

ナイシンは、プロセスチーズ、クリーム及び牛乳のような乳製品中の保存料として効果的に用いられてきた。プロセスチーズ中におけるナイシンの使用は最近の特許の課題であった。米国特許4,584,199号及び第4,597,972号を参照。あるグラム陽性バクテリアの増殖を阻害するためのナイシンの使用については充分に実証されている。しかしながら、食品保存料としてナイシンが完全に成功し受け入れられるためには、ナイシンがグラム陰性菌及び多くのグラム陽性菌に対し無効であるという考えがこれまでその障害となってきた。

た。グラム陰性菌はほとんど常にグラム陽性菌と共存しており、食品の腐敗及び汚染の主要原因となっている。1988年4月22日発行テイラー (Taylor) の米国特許第5584199号及び1986年7月1日発行テイラー (Taylor) の米国特許第4,597,972号、ツァイ (Tsai) 及びサンディーン (Sandine) の コンジュガル・トランスファー・オブ・ナイシン・プラスミド・ジーンズ・フロム・ストレプトコッカス・ラクチス7962・トウ・ロイコノストック・デキストラニカム181 (*Conjugal Transfer of Nisin Plasmid Genes from Streptococcus Lactis 7962 to Leuconostoc Dextranicum 181*), アブライド・エント・エンバイロメンタル・マイクロバイオロジー (Applied and Environmental Microbiology), 1987年2月, 352頁, "A・ナチュラル・プリーザーバティブ (A Natural Preservative)", フード・エンジニアリング・インターナショナル (Food Engineering Int'l), 1987年5月37-38頁, "フォーカス・オン・ナイシン (Focus on Nisin)", フード・マニュファクチャ (Food Manufacture), 1987年3月, 63頁を参照。

発明の要約

ナイシンから成る組成物が種々の非殺菌性薬剤と併用されると、ナイシン単独に比べてグラム陰性菌に対して強化広域殺菌活性を有したより広域のグラム陽性菌に対して強化活性を示すことが先の知見に反して今回見いだされた。グラム陽性菌に対する強化殺菌活性は、先の知見よりも広いpH範囲で発現する。

本発明は、例えば、キレート剤又は界面活性剤のような種々の非殺菌性薬剤と併用するナイシン又は他のランチオン含有バクテリオシン類のバクテリオシン組成物類を提供する。本発明は、更に、強化広域殺菌剤を得るために適切な担体に溶解又は懸濁した本組成物を提供する。

本発明の詳細な説明

例えばEDTAのようなキレート剤約0.1mMから20mMの存在下におけるナイシン約0.1μg/mlから300μg/mlの溶液は、ニシン単独に比べてサルモネラ・チフムリウム (*Salmonella typhimurium*)、エスシェリシア・コリ (*Escherichia coli*)、シュードモナス・エルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、バクテリオイデス・ギンギバリス (*Bacterioides gingivalis*)、アクテノバチラス・アクチノマイセテスコミタンス (*Actinobacillus actinomycetescens*) 及びクレブシエラ・ニューモニアエ (*Klebsiella pneumoniae*) のようなグラム陰性菌の増殖を実質的に消失させ、また、スタフィロコッカス・オーレウス (*Staphylococcus aureus*)、ストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*)、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、ストレプトコッカス・アガラクタエ (*Streptococcus agalactiae*) 及びコリネホルム (*Corynebacterium*) 菌のようなグラム陽性菌に対しては更に活性であることが特に見いだされた。キレート剤によるナイシン活性の増強は濃度依存性であるが、20mMを越えるEDTA濃度は予想に反しナイシン

の殺菌活性阻害性であった。しかしながら、タンパク質性担体及び血清アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、カゼイン及びケラチンのような多価ポリマー類の存在下においては、20mM以上のEDTA濃度によるナイシンの阻害は有意に低下し、それによってEDTAによるナイシンの強化の有用範囲が拡大された。

約0.1μg/mlから300μg/mlのナイシンと約0.1mMから20mMのキレート剤の溶液が約0.01%から1.0%の界面活性剤の存在下において、グラム陰性菌とグラム陽性菌に対するナイシンの有効性を増強することも同様に見いだされた。更に、界面活性剤の存在下においてナイシンはグラム陽性菌に対する活性を増強することも見いだされた。

本発明の適切なキレート剤としてEDTA、CaEDTA、CaNa₂EDTA及び他のアルキルジアミン四酢酸類、EGTA及びクエン酸塩が挙げられるが、これらに限定されるものではない。キレート剤として有用でEDTAの有無を問わずナイシンと併用する上で適切な界面活性剤として、ツウィーン類 (Tweens)、トリトン類 (Tritons) 及びグリセリドの非イオン性界面活性剤、脂肪酸のようなイオン性界面活性剤、四価の化合物、ドデシル硫酸ナトリウムのような陰イオン性界面活性剤、及びココミドプロピルベタイン及び乳化剤のような両性界面活性剤が挙げられる。

グラム陽性菌及びグラム陰性菌はほとんど常に共存して食品中に見られるので、サルモネラ・チフムリウム (*Salmonella typhimurium*)、エスシェリシア・コ

リ (*Escherichia coli*)、クレブシエラ・ニューモニアエ (*Klebsiella pneumoniae*)、シュードモナス・エルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、バクテリオイデス・ギンギバリス (*Bacterioides gingivalis*)、アクテノバチラス・アクチノマイセテスコミタンス (*Actinobacillus actinomycetescens*) のようなグラム陰性菌及び他のグラム陰性病原菌、及びグラム陽性菌に対してナイシン組成物が有効であることは、極めて有用であろう。この殺菌剤は、生の原料、プロセス食品及び飲料の細菌性病原体及び他の腐敗性微生物菌体による汚染の管理及び防止に特に適している。食品関連用途として、特に家きんの肉、卵、チーズ及び魚肉の処理及び食品包装と処理機器の処理が挙げられる。更に、プロセスチーズ、クリーム、牛乳、乳製品などにおける食品保存料としての用途、及び家きん肉、魚肉、獣肉、野菜及び乳製品及び食品のプロセス装置の洗浄における用途が挙げられる。ナイシン組成物の用途を食品関連用途だけに限定すべきではなく、このナイシン組成物はグラム陰性及びグラム陽性菌を除去する必要性又は要望があるあらゆる状況において有用であるはずである。

本組成物は例えば水溶性溶媒又は緩衝液に溶解することができ、又はいずれの適当な液体、コロイド性又はポリマー性基質中にも懸濁することができ、殺菌剤を生成する。本組成物すなわち殺菌剤は、感染治療、包帯又は外科手術用インプラント (埋入物) などの医療用途中軟膏又はコーティング剤に混合することがで

き、また、皮膚又は口腔うがい用広域消毒剤・消毒用ブラシ、清拭剤又はローション剤として取り入れることができる。本殺菌剤は、医療器具の洗浄用、手術用術前ブラシその他において用いることができる。本殺菌剤は、周辺環境の消毒を望んでいるが腐植性又は他の毒性残留物の危険があるために化学殺菌剤が除外されているような状況において特に有用である。

複雑な有機物の存在によってその活性が低下するほとんどの広域殺菌剤と異なり、本発明の組成物は牛乳又は血清のような有機物の存在下においても殺菌剤として有効である。

ナイシンは数種の近縁グラム陽性菌の増殖を最も良く阻害し、特にpH5.0においてあるグラム陽性芽胞形成性桿菌を阻害することが公知であった。キレート剤含有ナイシン溶液の殺菌活性は極めて迅速であり、pH5.0を超えるpH値で広域グラム陽性菌に対して本活性は増強されていた。更に、酸性及び塩基性の両pHにおいて、好適にはpH5.0から8.0の範囲において、グラム陰性菌に対して活性化された。キレート剤により活性化されたナイシンの殺菌活性がこのように予想外にも迅速でかつ広域であることによって、特に消毒剤としての用途に本ナイシンが適当とされている。

ナイシンは、ランチオン含有ペプチドバクテリオシンの綱に属する。この綱に属するものとしてまた、サブチリン、エピデルミン、シンナマイシン、ジェラマイシン、アンコベニン及び(pep) ペプ5が挙げられ

る。これらのバクテリオシンペプチドはそれぞれ異なる微生物によって産生される。しかしながら、バシラス・サブチラス (Bacillus subtilis) の培養物から得たサブチリン及びスタフィロコッカス・エピデルミジス (Staphylococcus epidermidis) の培養物から得たエピデルミンは、ナイシンの分子構造に極めて類似の分子構造を有していることが見いだされた [ハースト (Hurst), 85-86頁, 及びシュネル (Schnell) ら, ネーチャ (Nature), 333: 276-278を参照]。したがって、この分子類似性のために、他のランチオン含有ペプチドバクテリオシン類は、グラム陰性及びグラム陽性菌汚染の除去においてキレート剤及び非イオン性界面活性剤と併用しナイシンと同等に有効である。

ナイシン及び拡大して他のランチオン含有ペプチドバクテリオシン組成物のグラム陰性菌に対する殺菌剤としての有効性は驚異的であり、その理由として、先行技術が一般にこのナイシン活性について触れていないことが挙げられる。5.0を超えるpHにおいてEDTA存在下におけるグラム陽性菌に対するナイシンの増強活性は、これまでナイシン活性はpH5.0で至適であると確信されてきたので、予想外である。更に、ナイシン及びランチオン含有ペプチドバクテリオシン組成物の殺菌剤としての有効性が発見されたことによって、広域細菌に対し有効な許容可能でかつ天然由来の無毒の物質がないことに苦慮していた食料保存科学における長期にわたる必要性が満たされる。

ナイシン、EDTA及び／又は種々の界面活性剤含有組成物のグラム陰性及びグラム陽性の両菌に対する活性が優れておりしかも予測し得なかった程迅速であることを示すために、本殺菌剤を用いていくつか試験を行った。これらの試験は例示のためのみに記載されているのであり、本発明を限定するものではない。他のランタニン含有ペプチドバクテリオシン類はナイシンの代替物として有効であること、及びEDTA以外のキレート剤はEDTAの有効代替物であることが予測できる。

下記の実施例の試験は全て37℃で実施した。

強化広域殺菌剤の有効性は、殺菌剤処理後の細菌生存率パーセントで殺菌剤活性を検定し求めた。一般に、標的種の懸濁液1ml当たり 10^7 個の細胞をこの新規殺菌剤と一定時間インキュベート後2分間遠心分離し、細菌を集菌する。この細胞ペレットから本文でファージ (phage) バッファと命名した救援 (レスキュー) バッファ (50 mM Tris-HCl バッファ pH 7.8, 1 mM MgSO₄, 4 mM CaCl₂, 0.1 M NaCl 及び0.1%ゼラチン) で殺菌剤を洗い去り、再懸濁後ファージバッファ中に倍數希釈し、この懸濁細菌100mlを栄養寒天プレートに塗布した。37℃で24-48時間インキュベーション後、生存細菌をコロニー形成単位 (CFU) で求めた。本発明の有効殺菌剤は、初期生存細菌数の0.1%未満しか生存させないようなものとする。

実施例 1

グラム陰性菌 (S. チフムリウム (typhimurium)) に対するナイシン及びキレート剤の活性

表1に示したように、20 mM トリス (Tris), pH 8.0 中で37℃で2試験を行いナイシンとキレート剤EDTAのみを含有する殺菌剤の効果明らかにした。試験#1は対照でEDTAを含まない条件下で実施し、グラム陰性菌 S. チフムリウム (typhimurium) に対するナイシン単独の効果を示したものである。ナイシンの濃度上昇に伴い活性が一部発現するが、EDTAの非存在下における高濃度の活性は100 µg/ml ナイシン当たり1.6%生存率であり、食品保存料として全く不適当である。ナイシン及びEDTAから得た殺菌活性のレベルは有意である。

試験#2 (表1) はナイシンと20 mM EDTAを用いて実施し、標的グラム陰性菌の除去においてこのナイシン組成物の優れた活性を示している。

試験#2では20 mM EDTAとナイシン30 µg/mlの濃度で殺菌剤が S. チフムリウム (typhimurium) に対して著しい殺菌活性を示すこと、一方、100 µg/ml以上のナイシン濃度ではナイシン・EDTA殺菌剤が細菌を実質的に消失させる (生存率パーセント10%未満で、これはアッセイ中に全く生存殺菌がないことを示唆する)。したがって、EDTAとナイシンの併用がナイシン単独に比べて千倍を超える相乗活性を示す。

(以下余白)

表1

試験 #	初期生存細菌数	EDTA (mM)	ナイシン (µg/ml)	3時間インキュベーション後の生存率 (%)
1	3.0×10^6	0	100	51.3
2	5.7×10^6	20	2.5	1.6
			100	<10 ⁻⁴

実施例 2

グラム陰性菌 (S. チフイムリウム
(typhimurium)) に対するナイシン、
キレート剤及び界面活性剤の活性

4つの試験(表2)はナイシン及びEDTAと界面活性剤トリトン(Triton) X-100の双方を含有する殺菌剤の37℃、20mMトリス(Tris)、pH 8.0中におけるS. チフイムリウム(typhimurium)の効果を調べた。対照(試験#1)は、実施例1の対照と同じである(表1)。

試験#2(表2)は、ナイシンと1.0%トリトン(Triton) X-100を用いて行ったが、EDTAを用いなかった。この洗浄剤が存在しているだけでグラム陰性菌に対するナイシンの活性は阻害されナイシンは無効であった。しかし、本発明を説明する試験#3と#4ではトリトン(Triton) X-100と併用して20mM EDTAが存在することが、S. チフイムリウム(typhimurium)に対するナイシンの殺菌活性を著しく増強するひとつの殺菌剤となる。実際、トリトン(Triton) X-100とEDTAの併用でナイシンを含有しない場合でも有効であった。但し、ナイシンの存在下における場合よりもその度合は弱かった。#3と#4の両試験で(表2)ナイシン併用剤は極めて有効であったが、1.0%トリトン(Triton) X-100の濃度(試験#4、表2)が最も有効であった。

EDTAと併用して非イオン性界面活性剤トリトン(Triton) X-100が存在することによって、ナイシ

(以下余白)

実施例 3

グラム陰性菌 (S. チフイムリウム
(typhimurium)) に対するナイシン、
キレート剤及び界面活性剤の活性

表3は、37℃の20mMトリス(Tris)、pH 8.0中におけるナイシン、キレート剤EDTA 20mM及び非イオン性界面活性剤ツウィーン(Tween) 20含有殺菌剤のS. チフイムリウム(typhimurium)に対する活性の増強を示したものである。トリトン(Triton) X-100併用の場合と同じく(実施例2)、ナイシンとEDTAを(1%) ツウィーン(Tween) 20と併用することは最も有効である。

(以下余白)

表2

試験 #	初期生存 細菌数	EDTA (mM)	トリトン X-100 (%)	ナイシン (μ g/ml)	3時間後に50% S. チフイムリウムの生存率(%)
1	3.0×10^6	0	0	100	51.3
2	3.0×10^6	0	1.0	37.4	7.0
3	5.7×10^6	20	0.1	0.03	84.8
4	5.7×10^6	20	1.0	<10 ⁻⁴	47.0
				<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
				<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴

表3

試 験 #	初期生存 細菌数	EDTA (mM)	トリトン (%)	ナイシン (μg/ml)				
				0	10	30	100	300
1	3.0×10^6	0	0	100	51.3	-	1.0	1.6
2	5.7×10^6	20	0	2.5	-	$<10^{-3}$	-	$<10^{-4}$
3	4.3×10^6	20	1.0	$<10^{-3}$	-	$<10^{-4}$	-	$<10^{-4}$

殺菌剤としてのナイシンとEDTAの併用は、E. コリ (Coli) に対する有効性を千倍も相乗的に高めることが明らかである。試験#3と#4(表4)から、トリトン(Triton) X-100がE. コリ(Coli)に対する有意な殺菌活性を全く有していないことがわかる。実際、トリトン(Triton) X-100は、S. チフムリウム (typhimurium) でみられたと同様に(表2)グラム陰性菌に対するナイシン活性を阻害するようである。しかし、表2と4からわかるように、EDTAによるナイシンの全般的増強はトリトン(Triton X-100)の阻害効果を実質的に打消す。

ナイシン及びEDTAのようなキレート剤1種を含有する殺菌剤は、界面活性剤の存在下においてすらも種々のタイプのグラム陰性菌に対して有効な食品保存料であることが以上よりわかる。

実施例 5

グラム陰性菌 (クレブシエラ・ニューモニアエ (Klebsiella pneumoniae)) に対する

ナイシン及びキレート剤の活性

ナイシン及びEDTAのみを含有する殺菌剤のグラム陰性菌K. ニューモニアエ(pneumoniae)に対する効果が、表5に示したように明らかとなった。

(以下余白)

実施例 4

グラム陰性菌 (エスシェリシア・コリ (Escherichia coli)) に対するナイシン、キレート剤及び界面活性剤の活性

ナイシン及びEDTA含有殺菌剤のグラム陰性菌E. コリ(Coli)に対する殺菌剤の効果を明らかにし、表4に示した。

表4

試 験 #	初期生存 細菌数	トリトン		ナイシン (μg/ml)			
		EDTA (mM)	X-100 (%)	0	30	100	300
24時間におけるE. コリの生存率パーセント							
1	1.0×10^7	0	0	100	27	25	8.5
2	1.0×10^7	20	0	14.5	0.86	0.01	0.001
3	1.0×10^7	0	1.0	100	-	30	-
4	1.0×10^7	20	1.0	1.2	0.8	0.05	<10 ⁻⁴

37℃の20 mM トリス (Tris) バッファ溶液、pH 8.0 中で初期生存数を 1×10^7 個 E. コリ(Coli) 細胞/ml とし試験を行った。EDTA を含有した場合と含有しない場合がある。殺菌剤の効果は、2 時間後の細菌生存率パーセントの関数として求めた。

試験#1(対照、表4)ではEDTAを含有せず、ナイシンはE. コリ(Coli)の除去に対してほとんど有意味の活性を示さなかった。しかし、20 mM EDTAが存在する試験#2(表4)では、殺菌組成物はE. コリ(Coli)菌に対して実質的な活性を示した。ナイシン濃度の上昇に伴い本活性の有効性は増大した。

表5

試 験	初期生存 細菌数	トリトン		ナイシン (μg/ml)			
		EDTA (mM)	X-100 (%)	0	30	100	300
		24時間における生存率%					
1	10^7	0	0	100	-	50	30
2	10^7	20	0	22	0.5	1.1	0.005

EDTA使用試験を1回、非使用試験を1回、2回の試験を37℃の20 mM トリス (Tris) バッファ、pH 8.0 中で初期生存K. ニューモニアエ(pneumoniae)細胞数を 10^7 個/ml とし行った。本効果を2時間後の細胞生存率%の関数として測定した。

EDTA非使用試験#1(対照、表5)で、ナイシンはK. ニューモニアエ(pneumoniae)に対し意味のある殺菌活性をほとんど示さなかった。しかし、試験#2(表5)においては20 mM EDTAが存在し、本殺菌剤はK. ニューモニアエ(pneumoniae)に対し実質的な活性を示した。ナイシン濃度が上昇するに伴い本活性の有効性が高まった。

実施例 6

グラム陰性菌 (サルモネラ・チフムリウム (Salmonella typhimurium)) に対するナイシン
活性はキレート剤濃度に依存性である。

表6のデータは、グラム陰性菌 {S. チフムリウム (typhimurium)} に対するナイシンの増強活性化は、50 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.0又は20 mM トリス (Tris)、pH 8.0中のいずれかにおいて37℃でED

TA濃度に依存性であることを示している。

ナイシンを使用せず100mMまでのEDTA濃度を用いた試験#1と#3(対照, 表6)では、pH 5.0(#1)又はpH 8.0(#3)のいずれかにおいてS. チフムリウム(typhimurium) に対し有意味の活性をほとんど示さなかった。しかし試験#2及び#4(表6)では、ナイシン100μg/mlがEDTAと共存しており、本殺菌剤はS. チフムリウム(typhimurium) に対し実質的な活性を発現した。この殺菌剤の活性は酸性pH(5.0)でも塩基性pH(8.0)でも双方において同様であったが、このことは、ナイシン単独のグラム陰性菌に対する活性がpH 5.0で至適であるという事実と反していた。

EDTAによるナイシンの増強は、濃度依存性であり、pH値5.0及び8.0において0.2mMから10mMの範囲で至適となる。10mM EDTAを超える濃度においてEDTAによるナイシンの増強が低下するのは驚くべきことである。活性化の低下は、pH 5.0よりもpH 8.0で有意に著明である。

(以下余白)

表6

試験 #	pH	初期生存細菌数	ナイシン μg/ml	EDTA (mM)						24時間生存する細菌数	pH
				0	0.2	2.0	10	50	100		
1	5.0	3×10 ⁶	0	100	-	38.7	15.2	3.5	-	-	-
2	5.0	3×10 ⁶	100	0.6	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	0.004	0.02	-	-	-
3	8.0	5×10 ⁶	0	100	-	8.7	14	11.4	45	-	-
4	8.0	5×10 ⁶	100	4	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	0.5	30	-	-

実施例 7

グラム陰性菌 {S. チフムリウム(typhimurium) }
に対するナイシン及びキレート剤

EDTAによる生体組織存在下グラム陰性菌に対するナイシン活性の増強が、ニワトリの筋肉上のS. チフムリウム(typhimurium) で明らかとなり、表7に示した。

インキュベーションは、pH 5.0の50mM酢酸ナトリウム又はpH 8.0の20mMトリス (Tris) 中のいずれか中で37℃で行った。

さいの目にしたニワトリ筋肉を使用に先立ち次亜塩素酸ナトリウム及びポビドンヨウ素で洗浄した。本組織に接種するために、さいの目にしたニワトリ筋肉をpH 8.0の20mMトリス塩酸中S. チフムリウム(typhimurium) 懸濁液10⁸個細胞/ml中に浸漬した。過剰の水分は、浸漬立方体から振り落として除去した。ニワトリ試料は、本組織を覆うために充分な量のナイシン組成物含有バッファ中に入れ37℃で2時間インキュベートした後、本組織を覆うために充分な量のファージ (phage) バッファに本組織を移した。試験溶液中に残留する細菌を遠心分離によって集菌後ファージ (phage) バッファで洗浄し、ファージバッファによって組織から洗い出された細菌と合わせた。合わせた試料 ("非固着" 細胞と命名) を倍率希釈し、アリコット100μlを生菌細菌の測定のために塗布した。

ナイシン非存在下pH 5又はpH 8のいずれいかに

おける試験#1及び試験#3(表7)において、EDTA単独ではS. チフムリウム(typhimurium) の生存に有意の効果を示さない。しかし、ナイシン300μg/mlが存在する試験#2と#4(表7)では、ニワトリ筋肉上のS. チフムリウム(typhimurium) に対しpH 5.0及びpH 8.0の両pHで本殺菌剤は実質的な活性を示した。

EDTAによるナイシンの増強は濃度依存性であり、pH値5.0及び8.0の両値で0.3mMから10mM EDTAの範囲に至適濃度があった。pH 8.0において10mM EDTAを超える濃度では、EDTAによるナイシンの活性化が低下する。しかし、試験#5に示したように(表7)、pH 8.0において1.0%ウシ血清アルブミンの存在下では、ニワトリ筋肉上のS. チフムリウム(typhimurium) に対するナイシンの有効性が100mMまでのEDTA濃度全範囲で示される。

以上の如く、ナイシン及び0.1mMから20mMの範囲のEDTAのような低濃度のキレート剤含有殺菌剤は、グラム陰性菌による食品汚染の除去又は防止に極めて有効であり得る。

(以下余白)

表 7

試 験 #	pH	チンク μg/ml	2時間後における生存率%					25% (GSI)				
			0	0.1	0.3	1	3	10	20	30	100	
1	5.0	0	11.8	-	-	-	-	6.4	-	-	-	-
2	5.0	300	8.1	0.2	8.95	0.01	0.003	0.016	0.03	0.02	0.07	
3	8.0	0	100	-	-	-	-	5.2	-	-	-	
4	3.0	300	7.5	0.1	0.02	0.02	0.03	0.17	0.5	-	2.2	
5	3.0	300 *	0.02	0.09	0.0002	< 10 ⁻⁴	0.0004	0.003	-	0.03	0.03	

* 未回生細胞

① 10%のチンク (GSI) 含有

8

試料 #	初期生存 細菌數	EDTA 35A (mg)	(%)	0	0.1	0.3	1.0	3.0	10	30	100
1	6×10^6	0	0	100	-	-	-	-	51.3	-	1.6
2	6×10^6	1.0	1.0	63	9.7	0.08	0.01	0.05	0.01	$< 10^{-4}$	-

实施例 8

グラム陰性菌 {S. チフイムリウム (typhimurium) }
に対するナイシン活性の滴定

キレート剤の至適濃度下におけるトリス (Tis) バッファ中本殺菌剤のグラム陰性菌に対する有効性が実質的であることを明らかとし、表8に示した。

試験 # 2 から、1%ウシ血清アルブミン (BSA) 存在下 20 mM トリス (Tris), pH 8.0 中 1.0 mM EDTA を含む 0.3 μ g/ml ほどのわずかな量のナイシンが、S. チファムリウム (typhimurium) の生存を有意に低下することがわかる。本殺菌剤は、ナイシン単独がグラム陽性ストレプトコッカス (Streptococcus) に対し活性であるように、グラム陰性菌に対し活性である。

(以下余白)

实施例 9

グラム陰性菌 (S. テフイムリウム (typhimurium))
に対するナイシン活性の滴定

キレート剤の至適濃度下、生体組織存在下におけるグラム陰性菌に対する殺菌剤の有効性を、ニワトリ筋肉上 *S. ティフィマリウム* (*typhimarium*) で明らかにし、表9に示した。

さいの目にしたニワトリ筋肉を次亜塩素酸ナトリウム及びポビドンヨウ素で使用に先立ち洗浄した。本組織に接種するために、pH 8.0の20 mM トリス塩酸中 1.0×10^8 個細胞/ml の S. チフイムリウム (*typhimurium*) 懸濁液に浸漬した。過剰の水分を振り落して浸漬立方体から除去した。本組織を覆うのに十分な量のナイシン組成物含有バッファ中に本組織を入れ、37℃で2時間インキュベート後、本組織を覆うために十分な量のファージ (phage) バッファに移した。試験溶液中に残留する細菌を遠心分離によって集菌後ファージ (phage) バッファで洗浄し、ファージバッファによって本組織から洗い出された細菌と合わせた。合わせた試料 (“非固着”細胞と命名) を倍數希釈し、アリコート $100 \mu\text{l}$ を生存細菌の測定のために塗布した。

(以下余白)

実施例 10

グラム陰性菌 (S. チフイムリウム (typhimurium))
に対するナイシン EDTA 及び
メチルパラベン活性

ナイシン及び EDTA 含有殺菌剤を公知の食品保存料メチルパラベンと併用すると、グラム陰性菌に対しはぬけて有効であることが明らかとなり、表 10 に示した。

さいの目にしたニワトリ筋肉を次亜塩素酸ナトリウム及びポビドンヨウ素で使用に先立ち洗浄した。本組織に接種するために、さいの目にしたニワトリの筋肉を pH 5.0 の 50 mM 酢酸ナトリウムバッファ中 10^8 個細胞/ml の S. チフイムリウム (typhimurium) 懸濁液に浸漬した。過剰の水分を振り落して浸漬立方体から除去した。本組織を覆うために充分な量のナイシン組成物含有バッファ中に本組織を入れ、37℃で2時間インキュベート後、本組織を覆うために充分な量のファージ (phage) バッファに移した。試験溶液中に残留する細菌を遠心分離によって集菌後ファージ (phage) バッファで洗浄し、ファージバッファによって本組織から洗い出された細菌と合わせた。合わせた試料 ("非固着" 細胞と命名) を倍率希釈し、アリコット $100 \mu\text{l}$ を生存細胞の測定のために塗布した。

試験 #1 (表 10) では、10 mM EDTA の存在下メチルパラベンは、1.0% の濃度においてのみ S. チフイムリウム (typhimurium) に対し効果的であることが示された。しかし、試験 #2 (表 10) では、

表 9

試験 #	pH	初期生存 細菌数	EDTA 85% (mM)	0	10	ナイシン ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
						0	100	200	300
1	8.0	3×10^7	0	0	100	-	-	-	-
2	8.0	3×10^7	1.0	1.0	27	0.25	0.003	0.007	0.006

2時間後における生存率 %

300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ナイシンの存在下におけるメチルパラベンとナイシンの S. チフイムリウム (typhimurium) に対する有効性は実質的に改良された。

ナイシン及び EDTA 含有組成物は、食品保存料メチルパラベンの有用性を有意に向上させた。更に、本殺菌剤は、メチルパラベンのような一般に広く認められてはいるが好適性に劣る食品保存料の (使用の) 集実中を実質的に低下させることになるか、又はそれらに対する需要を消失させることになる。

(以下余白)

表 10

試験 #	初期生存 細菌数	ナイシン g/ml	EDTA ^a (mM)	メチルパラベン % / チフイムリウム			
				0	0.1	1.0	10
1	3×10^6	0	10	11.8	1.0	10^{-4}	10^{-4}
2	3×10^6	300	10	0.03	$< 10^{-3}$	$< 10^{-3}$	$< 10^{-4}$

b 50 mM 酢酸ナトリウムバッファ, pH 5.0

c 非固着細胞

実施例 11

グラム陽性菌 (*Staphylococcus aureus* (スタフィロコッカス・オウレウス)) に対するナイシン及びキレート剤の活性

キレート剤によるナイシンの活性化はpH依存性である。表11のデータは、pH8.0においてよりもpH5.0においてナイシンが*S. オウレウス* (*aureus*) に対し幾分殺菌性が強くなることを確認したものである。pH5.0においてEDTAは*S. オウレウス* (*aureus*) に対しナイシン活性を増強しないが、1.0mMを超えるEDTA濃度においてはナイシンの殺菌活性に阻害性となる。しかし、pH8.0におけるEDTA活性化ナイシンの殺菌活性はナイシン単独又はpH5.0のEDTAと併用した時よりも有意に高い。

ナイシン単独の殺菌活性は、pH5.0以下で最大となると報告されており(ハースト(Hurst)参照)、表11に示すデータはこれを裏付けるものである。本知見に基づき、*S. オウレウス* (*aureus*) に対するEDTAのナイシン活性化はより低いpHで同様に最大になると考えられてきた。しかし、表11でわかるようにまた予測に反して(表6参照)、EDTAがpH5.0においてグラム陽性菌に対するナイシン活性を増強することは観察されなかった。しかし、EDTA高濃度によるナイシン活性の阻害はpH5.0においてもまだ認められた。従って、キレート剤によるナイシン活性化はある濃度範囲のキレート剤においてのみ

起こり、グラム陽性菌に関してはpH5.0を超える好適なpH範囲のpHに依存性である。

(以下余白)

表11

スタフィロコッカス・オウレウスに対するナイシン及びEDTAの殺菌活性に及ぼすpHの影響

pH	ナイシン mg/ml	EDTA mM						24時間後における生存率 (%)
		0	0.1	0.3	1.0	3.0	10	
8.0	0	100	-	100	81	100	100	-
8.0	3.0	7.4	0.03	0.01	0.2	0.4	3	56
5.0	0	100	-	-	-	100	-	-
5.0	3.0	0.6	1.0	1.3	1.4	1.8	-	34

a 菌懸液濃度: 8.0×10^6 CFU/ml

b インキュベーションはpH5.0の50mM緩衝液で行った

20mMのEDTAは緩衝液の成分として含まれた

実施例 12

グラム陽性菌に対するナイシン及びキレート剤活性

ナイシン殺菌活性に及ぼすEDTAのpH8.0における効果は、重要ヒト病原体の1種である*S. オウレウス* (*aureus*) に限定されておらず、菌垢の原因であるストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*) (表12A)、食物運搬病原体の1種リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) (表12B)、及び体臭の寄与因子であるコリネホルム (*Corynebacterium*) 従属細菌類の混合群 (表12C) でも観察されている。

(以下余白)

表 12 A
ストレプトコッカス・ミュータンスに対する
ナイシンの殺菌活性に及ぼす EDTA の効果

pH	ナイシン μg/ml	EDTA mM					
		0	0.01	0.1	0.3	1.0	3.0 10 30 100
8.0 0	100	-	-	-	-	-	-
8.0 0.1	4.3	1.8	0.04	0.02	0.06	1	25 100 100

a 初期生菌数: 5.0×10^8 cfu/ml

b インキュベーションは pH 8.0 の 20 mM トリス緩衝液中で行った。

表 12 B
リスデリア・モノサイトゲネスに対する
殺菌活性に及ぼす EDTA の効果

ナイシン		EDTA mM							
pH	μg/ml	0	0.1	0.3	1.0	3.0	10	30	100
8.0	0	100	-	-	-	-	-	-	-
8.0	3.0	0.71	0.04	0.04	0.02	0.1	0.64	10	14

a 初期生菌数: 5.0×10^8 cfu/ml

b インキュベーションは pH 8.0 の 20 mM トリス緩衝液中で行った。

表 12 C
コリネホルム菌に対するナイシン
殺菌活性に及ぼす EDTA の効果

pH	ナイシン μg/ml	EDTA mM					
		0	0.1	0.3	1.0	3.0	10
2 時 菌 数 × 生 存 率							
8.0	0	100	-	4.6	3.6	8	36
8.0	3	0.22	0.03	0.0009	0.1	-	0.16

a 初期生菌数: 1.0×10^8 cfu/ml

インキュベーションは pH 8.0 の 20 mM トリス緩衝液中で行った。

実施例 13

キレート剤活性化ナイシンの迅速殺菌活性

EDTA 含有ナイシンから成る殺菌剤は、表 13 A に示したデータによって例示されるように殺菌性が迅速である。10⁷ 個細胞/ml のグラム陽性菌 *S. ミュータンス* (*mutans*) 懸濁液を pH 7.3 の 20 mM トリス (Tris) バッファ中である範囲の濃度の 1 mM EDTA 活性化ナイシンと 37℃ でインキュベートした。この懸濁液は 0.5 分から 60 分の範囲の種々の時間にわたり前記殺菌剤とインキュベートした。本殺菌剤の殺菌剤としての有効性を生存細菌のパーセントを求めることによって推定した。EDTA によって増強されたナイシンはこの処方において 10 μg/ml の少量で、1 分間以内に 6 対数目盛だけ細菌数を減少させることができる。

迅速な殺菌活性は、有効消毒のための前提条件である。従って、本組成物は特に本文で明らかとしたように、口腔洗浄剤・うがい薬・歯みがき粉又は歯垢形成 *S. ミュータンス* (*mutans*) に有効な他類似歯科用品 (dentifrice) の成分として有効な殺菌剤であることが予測される。

EDTA 増強ナイシンのグラム陰性菌に対する 2-3 時間後の活性を実施例 1-7 に示した。EDTA 増強ナイシンの迅速殺菌活性は、同様にグラム陰性菌に対しても見られ、このことは表 13 B のデータによっても例示される。

(以下余白)

表 1 3 A
EDTAによる増強ナイシンのストレプトコッカス
・ミュータンスに対する殺菌活性動態

インキュベーション 時間 (分)	1.0mM EDTA含有ナイシン $\mu\text{g/ml}$					
	0	1	3	10	30	100
	生存率 %					
0.5	-	-	-	-	-	$<10^{-4}$
1	-	-	-	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$
3	100	0.5	0.002	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	-
15	-	0.03	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	-	-
30	-	-	$<10^{-4}$	-	-	-
60	100	0.003	-	-	-	-

a 対照生存細胞数: 1.9×10^7 cfu/ml
インキュベーションはpH7.3の20mMトリス緩衝液中37℃で行った。

表 1 3 B
EDTAによる増強ナイシンのエッセンスヒビ7
・コリに対する迅速殺菌活性

mM EDTA	ナイシン $\mu\text{g/ml}$					
	0	0.3	1.0	3	10	30 100
	1分時に残る生存率 %					
1.0	100	100	55	0.37	0.013	0.015 0.008

・対照生存数: 1.0×10^7 cfu/ml
インキュベーションはpH7.9の20mMトリス中で37℃で行った。

実施例 1 4

ナイシン活性のEDTA増強に及ぼす二価カチオンの効果

二価のカチオンはEDTA及び他のキレート剤に結合し、EDTAによるナイシンの活性化を中和すると予測される。しかし、表14のデータによってわかるように、*S. ミュータンス* (*S. mutans*) に対するナイシンの殺菌活性は、1mMの Ca^{2+} イオンの存在下においてさえも1mM EDTAによって増強される。3mMを超えた場合にのみ、 Ca^{2+} イオンはEDTA活性化ナイシンに阻害性であった。これは特に、カルシウムイオン濃度が関連する口腔洗浄外用剤において重要である。

(以下余白)

表 1 4
二価のカチオン存在下における
ストレプトコッカスミュータンスに
対するEDTA活性化ナイシンの迅速殺菌活性

ナイシン	CaCl_2 mM					
	0	0.1	0.3	1.0	3	10
	1分時に残る生存率 %					
0	100					
3	2.9					
3 ^c	0.0042	0.0042	0.052			18
30 ^c	0.0019	0.0003	0.0004	0.06	6.8	
100 ^c	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	0.0001	1.5

EDTA Na_2 EDTA

a 対照生存数: 1.0×10^7 cfu/ml

インキュベーションはpH7.9の20mMトリス中で37℃で行った。

実施例 15

グラム陽性菌に対するナisin及び界面活性剤活性

ナisinの殺菌活性は、界面活性剤1種のみと併用した時も同様に有意に増強される。このことは、表15Aに示したようにある限られたナisin濃度(0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で最も良く例示される。0.1%までの濃度において食品等級の界面活性剤モノラウリンは、複合媒体牛乳中のストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*) に対し有意の殺菌活性をほとんど示さなかった。ナisinは0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの濃度において同様に牛乳中において有意の殺菌活性を示さなかった。しかし、0.1%モノラウリンと0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のナisinの2薬剤の併用は、S. アガラクチアエ (*agalactiae*) に対し極めて強力である。この殺菌剤は、相加効果で期待されるよりも百倍以上強力であり、上記薬剤のいずれかを単独で用いる時よりも1万倍強力である。従って、ナisinの適用をその使用可能な活性に限定する時、界面活性剤1種を含有するナisinから成る殺菌剤はさらに有用であると期待できる。

ナisinの適用をその有効活性に限定した例を表15Bのデータによって例示した。ナisin及び特にナisinとEDTAから成る殺菌剤は、モノサイトゲネス (*monocytogenes*) に対して殺菌性であるが、表15Bのデータは、牛乳のような複合媒体においてこの有機物に対する有効なナisin活性が制約を受け

ることを示している。しかし、グリセリドのモノオレアートとナisinから成る殺菌剤はこの食物運搬病原体に対して牛乳中においても有効である。但し、モノオレアート自体はこの有機物に対し全く殺菌性を有していない。

(以下余白)

表 15 A

牛乳中ストレプトコッカスアガラクチアエ
に対する37℃におけるナisin殺菌活性
(モノラウリンによるナisinの活性化)

ナisin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	モノラウリン		
	0	0.01	0.1
	2時間後における生存率%		
0	100	100	4.5
0.02	100	100	0.2
0.2	2.2	0.95	0.0008

a 初期生存数 : 6.0×10^7 cfu/ml
インキュベーションは37℃の牛乳中で行った。

表 15 B

37℃の牛乳中リステリア モノサイトゲネス
に対するナisinの殺菌活性
(モノオレアートによるナisinの活性化)

ナisin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	モノオレアート%		
	0	0.1	1.0
	2時間後の生存率%		
0	100	67	63
100	0.56	10^{-3}	10^{-4}

a 初期生存数 : 5.0×10^7 cfu/ml
インキュベーションは37℃の牛乳中で行った。

<p>L. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (Inventor's classification) (IPC Class. 41)</p> <p>IPC: A 23 C 19/11, A 61 K 37/02</p>										
<p>M. FIELD OF SEARCH</p> <p>Classification System: A 23 C, A 61 K</p>										
<p>N. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category</th> <th>Document</th> <th>Relevance</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>GB, A, 738655 (APLIN & BARRETT LTD) 19 October 1955, see page 2, line 115 - page 3, line 28</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Chemical Abstracts, vol. 26, no. 1, 3 January 1977, (Columbus, Ohio, US), A.I. Fedenko et al.: "Effect of the antibiotic nisin on pathogenic staphylococci and streptococci" see page 58, abstract no. 594x 6 Tr. 5'eda Mikrobiol. Ukr. 4th 1975, 221-2</td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table>		Category	Document	Relevance	X	GB, A, 738655 (APLIN & BARRETT LTD) 19 October 1955, see page 2, line 115 - page 3, line 28	1-16	A	Chemical Abstracts, vol. 26, no. 1, 3 January 1977, (Columbus, Ohio, US), A.I. Fedenko et al.: "Effect of the antibiotic nisin on pathogenic staphylococci and streptococci" see page 58, abstract no. 594x 6 Tr. 5'eda Mikrobiol. Ukr. 4th 1975, 221-2	1-16
Category	Document	Relevance								
X	GB, A, 738655 (APLIN & BARRETT LTD) 19 October 1955, see page 2, line 115 - page 3, line 28	1-16								
A	Chemical Abstracts, vol. 26, no. 1, 3 January 1977, (Columbus, Ohio, US), A.I. Fedenko et al.: "Effect of the antibiotic nisin on pathogenic staphylococci and streptococci" see page 58, abstract no. 594x 6 Tr. 5'eda Mikrobiol. Ukr. 4th 1975, 221-2	1-16								
<p>IV. CERTIFICATION</p> <p>Date of the Actual Completion of the International Search: 2nd October 1989</p> <p>Date of Mailing of the International Search Report: 24 OCT 1989</p> <p>Signature of Searching Authority: T.K. WILLIS</p>										

The names and the patent family members relating to the parent document filed in the above-mentioned international search report. The members are as indicated in the European Patent Office (EPO) on 18/10/89. The European Patent Office is in no way liable for those particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
GB-A- 738655		None	

For more details about this patent, see Official Journal of the European Patent Office, No. 17/81

第1頁の続き

⑤Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号
A 23 C 13/10		8114-4B
19/11		8114-4B
A 23 L 3/3526	5 0 1	6977-4B
C 11 D 3/48		7614-4H
// A 61 K 7/16		7252-4C

優先権主張 ②1989年3月1日③米国(US)③317,626

②発明者 ボラツク ジューン

アメリカ合衆国 11201 ニューヨーク州 ブルックリン モンター
ーギョ ストリート 57

②発明者 ガシツク サラ・アン

アメリカ合衆国 10003 ニューヨーク州 ニューヨーク ファー
スト アヴェニュー 317

②発明者 ルビーノ ステファン デイ
ー。

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ハリソン ヘンリー アヴェニ
ュー 111